

# **TGF $\beta$ Signaling in Myeloid and Endothelial Cells Is Required for Lung and Liver Metastasis**

---

## **Dissertation**

zur

Erlangung der naturwissenschaftlichen Doktorwürde

(Dr. sc. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Zürich

von

Cristina Ștefănescu

aus

Rumänien

## **Promotionskomitee**

Prof. Dr. Anne Müller (Vorsitz)

Prof. Dr. Lubor Borsig (Leitung)

Prof. Dr. Lukas Sommer

Prof. Dr. Peter ten Dijke

Zürich, 2020

## Contents

<b>Summary .....</b>	<b>4</b>
<b>List of abbreviations .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>1. Cancer .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>1.1 General characteristics .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Hallmarks of cancer.....	Error! Bookmark not defined.
<b>1.2. Tumor initiation .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>1.3. Metastasis .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Invasion of local tissue .....	Error! Bookmark not defined.
Intravasation .....	Error! Bookmark not defined.
Survival in circulation .....	Error! Bookmark not defined.
Extravasation .....	Error! Bookmark not defined.
Colonization of new tissues and tumor cell dormancy.....	Error! Bookmark not defined.
<b>2. Tumor microenvironment .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>2.1. Cancer-associated fibroblasts.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>2.2 Neutrophils.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>2.3 Monocytes.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>2.4. Macrophages .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>2.5. Dendritic cells .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>2.6. Natural killer cells .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>2.7. CD4+ T cells .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>2.8. CD8+ T cells.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>2.9. Endothelial cells.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>3. Cytokines and chemokines .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>4. Transforming Growth Factor <math>\beta</math> (TGF<math>\beta</math>) .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>4.1. Bone morphogenetic proteins, inhibins and activins.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>4.2. Physiological roles of TGF<math>\beta</math>.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>4.3. TGF<math>\beta</math> receptors.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>4.4. TGF<math>\beta</math> in cancer .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>4.5. TGF<math>\beta</math> in metastasis.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>Scientific Aims .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>Results .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

## CONTENTS

<b>TGF<math>\beta</math> signaling in myeloid cells promotes lung and liver metastasis though different mechanisms</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>TGF<math>\beta</math> signaling in endothelial cells mediates lung metastasis.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>TGF<math>\beta</math> expression by tumor cells is essential for tumorigenesis and metastasis. Error! Bookmark not defined.</b>	
<b>Discussion.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>Appendix .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>Acknowledgments.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>CV .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

## Summary

Metastasis is one of the main cause of death of cancer patients. Tumors are composed of a combination of cancer cells and stromal cells whose communication is crucial in their function. Endothelial cells play a role in the extravasation step of metastasis. Immune cells are part of the tumor infiltrate and are implicated in all the steps of metastasis. Myeloid derived cells such as monocytes, granulocytes and macrophages support tumor progression. TGF $\beta$  is a cytokine that control several physiological processes, such as cell proliferation, differentiation, and angiogenesis. In cancer, it switches from an inhibitory effect in early carcinogenesis to a promoting effect in late cancer progression. We used an experimental and spontaneous metastasis mouse model to assess the role of TGF $\beta$  signaling in myeloid and endothelial cells during metastasis.

Mice with *Tgfb2* deficiency in myeloid cells (LysMCreTR2<sup>fl/fl</sup>-TR2<sup>myelo</sup>KO) had lower number of liver and lung metastasis. Decreased metastasis associated with decreased number of monocytes and neutrophils in the metastatic liver and lower number of macrophages in the early metastatic lung. The accumulation of myeloid derived cells in the liver foci was absent in TR2<sup>myelo</sup>KO mice. In the early metastatic liver and lung the monocytes unresponsive to TGF $\beta$  had a more M1 anti-tumorigenic phenotype. The decreased lung but not liver metastasis in TR2<sup>myelo</sup>KO mice was dependent on CD8 T cells.

TGF $\beta$  signaling in endothelial cells is critical in embryonic development. We used a tamoxifen inducible mouse model for endothelial specific deficiency of TGF $\beta$ RII (VECadCreERT2/TRII<sup>fl/fl</sup>). Treated mice had lower number of lung metastasis in a spontaneous model. An immortalized mouse brain endothelial cell line showed increased phosphorylation of proteins associated with contractility. The increased phosphorylation suggests that decreased endothelial contraction and vascular permeability could be responsible for decreased lung metastasis in mice with temporal endothelial deficiency of TGF $\beta$  signaling. We showed that myeloid and endothelial TGF $\beta$  signaling is crucial for lung and liver metastasis and represent a valuable therapeutic target.

## Zusammenfassung

Metastasierung ist eine der Haupttodesursachen bei Krebspatienten. Tumore bestehen aus einer Kombination von Krebszellen und Stromazellen, deren Kommunikation für ihre Funktion entscheidend ist. Endothelzellen spielen eine Rolle im Extravasationsschritt der Metastasierung. Immunzellen sind Teil des Tumorinfiltrats und sind an allen Metastasierungsschritten beteiligt. Myeloide Zellen wie Monozyten, Granulozyten und Makrophagen unterstützen das Fortschreiten des Tumors. TGF $\beta$  ist ein Zytokin, das verschiedene physiologische Prozesse wie Zellproliferation, Differenzierung und Angiogenese steuert. Bei Krebs geht es von einer hemmenden Wirkung bei der frühen Krebsentstehung zu einer fördernden Wirkung bei der späten Krebsentwicklung über. Wir verwendeten ein experimentelles und spontanes Metastasierungs-Mausmodell, um die Rolle des TGF $\beta$ -Signals in myeloidischen und Endothelzellen während der Metastasierung zu untersuchen.

Mäuse mit *Tgfr2*-Mangel in myeloiden Zellen (LysMCreTR2<sup>fl/fl</sup>-TR2myeloKO) hatten eine geringere Anzahl von Leber- und Lungenmetastasen. Verringerte Metastasierung in Verbindung mit einer verringerten Anzahl von Monozyten und Neutrophilen in der metastasierten Leber und einer geringeren Anzahl von Makrophagen in der frühen metastasierten Lunge. Die Akkumulation von myeloischen Zellen in den Leberfoci war bei TR2myeloKO-Mäusen nicht vorhanden. In der frühen metastasierten Leber und Lunge hatten die auf TGF $\beta$  nicht reagierenden Monozyten einen eher M1-anti-tumorigenen Phänotyp. Die verringerte Metastasierung der Lunge, aber nicht der Leber in TR2myeloKO-Mäusen war von CD8-T-Zellen abhängig.

Die TGF $\beta$ -Signalübertragung in Endothelzellen ist für die Embryonalentwicklung von entscheidender Bedeutung. Wir verwendeten ein Tamoxifen-induzierbares Mausmodell für einen endothelspezifischen Mangel an TGF $\beta$ RII (VECadCreERT2/TRII<sup>fl/fl</sup>). Behandelte Mäuse wiesen in einem spontanen Modell eine geringere Anzahl von Lungenmetastasen auf. Eine immortalisierte Maushirn-Endothelzelllinie zeigte eine erhöhte Phosphorylierung von Proteinen, die mit Kontraktilität assoziiert sind. Die erhöhte Phosphorylierung lässt vermuten, dass eine verminderte Endothelkontraktion und Gefäßpermeabilität für eine verminderte Lungenmetastasierung bei Mäusen mit einem zeitlichen endothelialen Mangel der TGF $\beta$ -Signalübertragung verantwortlich sein könnte. Wir haben gezeigt, dass myeloische und endotheliale TGF $\beta$ -Signale für die

## SUMMARY

Metastasierung von Lunge und Leber von entscheidender Bedeutung sind und als Therapieziel verwendet werden könne

